吡哆醛激酶基因在家蚕体内的时空表达特征

谢艳凤[1], 张剑韵[2], 黄龙全[1,*]

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要:【目的】了解家蚕 *Bombyx mori* 维生素 B_6 关键代谢酶吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PLK)在家蚕不同组织间的表达差异。【方法】原核表达家蚕重组 PLK, 获得目的蛋白制备多克隆抗体, 利用 Western blot 方法对 PLK 在家蚕不同发育时期、5 龄第 3 天幼虫不同组织及 5 龄不同日龄幼虫表皮、头部和马氏管中的表达进行分析; 并采用实时荧光定量 PCR 的方法对 PLK 基因在家蚕不同组织中的 mRNA 转录水平进行比较。【结果】PLK 在家蚕 5 龄幼虫的表达水平最高, 在 5 龄第 3 天幼虫各组织中的表达由高到低依次为: 精巢、马氏管、表皮、中肠、头部、卵巢、脂肪体、丝腺; 5 龄期不同日龄幼虫表皮组织的表达差异最大, 头部和马氏管中均为前期表达量稍高于后期。在转录水平方面, 精巢的表达量最高, 其次是马氏管和头部。【结论】PLK 在家蚕不同发育时期及组织中的差异表达进一步证实 PLK 在家蚕 VB_6 代谢中的生物学功能的重要性。

关键词: 家蚕; 吡哆醛激酶; 表达分析; 实时荧光定量 PCR; Western blot

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2011)11-1319-05

Characterization of temporal and spatial expression of pyridoxal kinase gene in *Bombyx mori*

XIE Yan-Feng[1], ZHANG Jian-Yun[2], HUANG Long-Quan[1,*] (1. College of Tea & Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract:【Aim】To identify the differential expression of pyridoxal kinase (PLK), which is a key enzyme related to VB_6 metabolism, in different tissues of *Bombyx mori*.【Methods】The recombinant plasmid was transformed to *Escherichia coli* Rosetta for induction, expression and purification, and then the polyclonal antibody was prepared. The expression of PLK at different developmental stages, in different tissues of day-3 5th instar larva and in the tissues of cuticle, head and Malpighian tubules on different days of the 5th instar was analyzed by Western blot. The transcription level of PLK gene in different tissues was analyzed by real-time PCR.【Results】The highest expression level of PLK was found in the 5th instar larva. The expression order in various tissues of day-3 5th instar larva from high to low was spermary, Malpighian tubules, cuticle, midgut, head, ovary, fat body and silk glands. The transcriptional analysis of PLK gene on different days of the 5th instar showed that the biggest difference in expression level was in cuticle, and slightly higher on the early days in head and Malpighian tubules. Real-time PCR results showed that PLK gene was highly expressed in spermary, and moderately expressed in Malpighian tubules and head.【Conclusion】The differential expression of PLK gene at different developmental stages and in different tissues of the 5th instar larva further reveals the importance of PLK related to VB_6 metabolism in *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; pyridoxal kinase; expression analysis; real-time PCR; Western blot

维生素 B_6(VB_6)是一类吡啶化合物的总称, 基本型有吡哆醇(pyridoxine, PN)、吡哆胺(pyridoxamine, PM)和吡哆醛(pyridoxal, PL), 相应的磷酸酯型为磷酸吡哆醇(pyridoxine 5′-phosphate, PNP)、磷酸吡哆胺(pyridoxamine 5′-phosphate, PMP)和磷酸吡哆醛(pyridoxal 5′-phosphate, PLP)。其中 PLP 是 VB_6 的主要辅酶形式, 参与氨基酸代谢的各种反应(Kerry *et al*., 1986)。吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PLK, EC 2.7.1.35)是 VB_6 关键代谢酶(Wrenger *et al*., 2006), 与 PNP/PMP 氧化酶

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870338)

作者简介: 谢艳凤, 女, 1984 年生, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品卫生学, E-mail: swxyf209@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: lqhuang218@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2011-05-18; 接受日期 Accepted: 2011-09-20

(PNP/PM Poxidase, EC 1.4.3.5)一起维持细胞内 PLP 浓度的动态平衡，前者在二价金属阳离子和 ATP 存在下，催化游离型 VB_6 各自磷酸化反应，生成相应的磷酸酯型；后者将 PNP 或 PMP 转变为 PLP。Hurwitz (1953) 首先从酿酒酵母中纯化出 PLK，并对其性质做了初步研究；随后兔、牛脑、猪脑、羊脑中的 PLK 也得到了纯化(McCormick *et al*., 1961; Neary and Drven, 1970; Kwok and Churchich, 1979; Kerry *et al*., 1986)。近年来关于 PLK 的分离纯化、酶学性质、空间结构等已多有报道(Maras *et al*., 1999; Lum *et al*., 2002; Safo *et al*., 2004 ; Salvo *et al*., 2004; Cao *et al*., 2006)。

家蚕是用于蚕丝生产的重要经济昆虫，VB_6 对蚕体氨基酸代谢、脂肪酸代谢以及转氨酶活力有较大影响(张剑韵和黄龙全，2003a)。家蚕虽然同属 VB_6 异养型生物，但家蚕体内 VB_6 代谢和哺乳动物存在差异(张剑韵和黄龙全，2003b)。本实验室已克隆出家蚕 PLK cDNA，并对家蚕 PLK 的基本酶学性质进行了分析(Shi *et al*., 2007; 张平平等, 2010)。本研究在此基础上原核表达家蚕重组 PLK，获得目的蛋白制备多克隆抗体，用荧光定量 PCR 和 Western blot 方法对 PLK 基因进行表达分析，从 mRNA 水平和蛋白质水平上研究该基因在家蚕 5 龄幼虫期不同组织中的转录、表达情况，明确了 PLK 在家蚕 5 龄期不同组织中的功能。

1 材料与方法

1.1 试虫、材料及主要试剂

供试家蚕品种为青松×皓月，由安徽农业大学蚕桑研究所提供，于自然条件下桑叶喂养，5 龄各天幼虫及卵、蛹、蛾均冷冻于 -80℃ 冰箱保存备用。大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5α、重组质粒 pET22b-His-PLK 和表达载体 *E. coli* Rosetta 为安徽农业大学茶叶生物技术重点实验室保存；新西兰兔购自安徽医科大学实验动物中心。

Taq 酶、DNA Marker、蛋白质 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司；硝酸纤维素膜、Triton X 100、IPTG 购自上海生物工程公司；Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司；弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司；山羊抗兔 Ig G-HRP 购自中杉金桥；超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天；PCR 引物、Oligo(dT)由上海生工合成；M-MLV 反转录试剂盒、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司；其余试剂均为国产分析纯。

1.2 家蚕重组蛋白的原核表达与纯化

蛋白纯化方法参照张平平等(2010)，略有改动。重组质粒 pET22b-His-PLK 转入 *E. coli* Rosetta 中并接种于 10 mL LB 液体培养基(50 μg/mL Amp、34 μg/mL CM)，37℃、220 r/min 培养过夜，然后接种于 1 L 新鲜的培养基中，30℃继续培养 3 h，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，16℃诱导培养 12 h。离心收集菌体后超声破碎，粗酶液经过 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow(GE)分离和纯化，用平衡缓冲液(20 mmol/L imidazole, 5 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L Na_2HPO_4, 4.5 mmol/L NaH_2PO_4, pH 7.4)、冲洗液Ⅰ(40 mmol/L imidazole, 5 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L Na_2HPO_4, 4.5 mmol/L NaH_2PO_4, pH 7.4)、冲洗液Ⅱ(100 mmol/L imidazole, 5 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L Na_2HPO_4, 4.5 mmol/L NaH_2PO_4, pH 7.4)洗去杂蛋白，洗脱液(300 mmol/L imidazole, 5 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L Na_2HPO_4, 4.5 mmol/L NaH_2PO_4, pH 7.4)洗脱目的蛋白并进行超滤浓缩。

1.3 多克隆抗体制备

1 mL 1 mg/mL 目的蛋白与等体积弗氏完全佐剂充分混合后免疫新西兰兔；0.5 mL 1 mg/mL 目的蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混合，每隔一星期进行一次加强免疫，共 4 次。最后一次免疫后 7 d 禁食 24 h 心脏采血，收集抗血清。间接 ELISA 方法测定抗体效价，Western blot 检测抗体特异性。

1.4 家蚕 PLK 蛋白表达的 Western blot 检测

分别取来自 2 个个体的卵、5 龄幼虫、蛹、蛾期的家蚕，来自 7~8 个个体的 5 龄幼虫第 3 天的家蚕各组织和 5 龄幼虫期各天的表皮、头部、马氏管组织，用液氮研磨至粉末溶解在蛋白提取裂解液中，冰上放置 30 min；4℃ 12 000 r/min 离心 10 min，取上清 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，所得上清即为总蛋白。取等量的各发育时期、各组织的总蛋白进行电泳(每泳道 150 μg 蛋白)，将硝酸纤维素膜和凝胶浸入转移缓冲液中 30 min，电转移上进行转膜，丽春红染色，剪取所需条带放入 TBS 中洗膜，加封闭液轻摇 2 h；将膜浸入含一抗(1∶2 000)的封闭液中继续轻摇 1 h；洗膜 4 次后将膜转入含荧光标记的羊抗兔二抗(1∶5000)的封闭液中，室温轻摇 1 h；再洗膜 3 次后转入 TBS 中洗 2 次，ECL 发光试剂曝光。

1.5　家蚕 PLK 基因 mRNA 转录水平的荧光定量 PCR 检测

用 Trizol 法提取 2 头家蚕 5 龄幼虫的头部、表皮、丝腺、脂肪体、马氏管、中肠、精巢和卵巢等 8 个组织的总 RNA，根据家蚕 PLK 基因序列使用引物设计软件 Primer Premier 5.0、Oligo 6 作辅助设计引物，同时选 18S rRNA 的一对引物作为内参。

PLK 基因：

上游引物：5′-GCACGAGACGGAGTTCAG-3′

下游引物：5′-AATACCCAAAGTGGAGGC-3′

18S rRNA：

上游引物：5′-CGATCCGCCGACGTTACTACA-3′

下游引物：5′-GTCCGGGCCTGGTGAGATTT-3′

按照 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明书合成第一链 cDNA。利用 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂进行荧光定量 PCR 反应，采用 BIO-RAD iQ5 实时荧光定量 PCR 仪进行检测。

1.6　数据统计与分析

利用 ABI Prism 7300 SDS Software (Applied Biosystems)对荧光定量 PCR 的结果进行 Ct 值以及基线自动分析。Ct 值是指每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数，模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，Ct 值越小。将分析的结果用 Excel 软件处理，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析蛋白表达的差异，$\Delta\Delta Ct$ = 未知样品 ΔCt − Calibrator ΔCt，其中：未知样品 ΔCt = 目的基因 Ct − 内参基因 Ct；Calibrator ΔCt = 参比样内参基因 Ct − 参比样目的基因 Ct。

2　结果与分析

2.1　家蚕 PLK 蛋白纯化及抗体特异性检测

纯化后目的蛋白纯度较高，没有发现杂带(图 1)。免疫结束用间接 ELISA 方法检测，抗体效价大于 1∶51 200。Western blot 检测抗体特异性良好，明显看到一条特异性条带(图 1)。

2.2　PLK 在家蚕不同发育时期及 5 龄第 3 天幼虫不同组织中的分布

用 Western blot 方法对家蚕不同发育时期及 5 龄第 3 天幼虫不同组织中的 PLK 蛋白表达量进行分析。对不同发育时期的家蚕来说(图 2)，PLK 在 5 龄阶段的表达量最高，卵、蛹、蛾中有表达但表达量不高且差异不明显；对 5 龄第 3 天幼虫来说，PLK 在马氏管和精巢中表达量较高，其次为头部、表皮和中肠，在脂肪体和卵巢中也可见明显表达，而在丝腺中则几乎未检测到(图 3)。

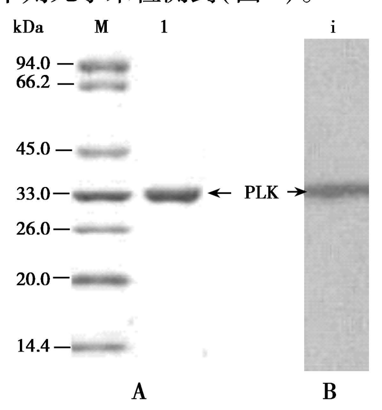


图 1　家蚕 PLK 的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B) 检测

Fig. 1　SDS-PAGE analysis (A) and Western blotting (B) of pyridoxal kinase of *Bombyx mori*

M：低分子量蛋白标准 Protein molecular weight marker；1：亲和层析纯化的重组蛋白 Purified recombinant protein by chelating；i：泳道 1 对应的 Western blotting 结果 The Western blotting result of lane 1.

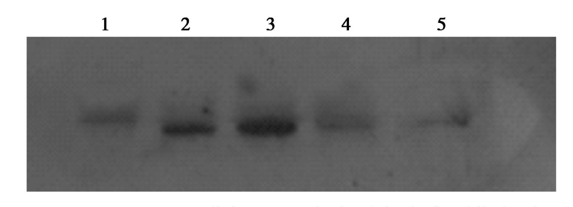


图 2　Western blot 分析 PLK 在家蚕各发育时期的表达

Fig. 2　Western blot analysis of pyridoxal kinase expression in different developmental stages of *Bombyx mori*

1：卵 Egg；2：4 龄幼虫 4th instar larva；3：5 龄幼虫 5th instar larva；4：蛹 Pupa；5：蛾 Moth.

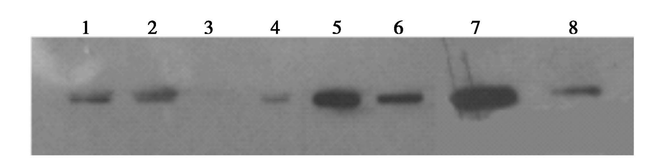


图 3　Western blot 分析 PLK 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织中的表达

Fig. 3　Western blot analysis of pyridoxal kinase expression in different tissues of day-3 5th instar larva of *Bombyx mori*

1：头部 Head；2：表皮 Cuticle；3：丝腺 Silk glands；4：脂肪体 Fat body；5：马氏管 Malpighian tubules；6：中肠 Midgut；7：精巢 Spermary；8：卵巢 Ovary.

对家蚕 5 龄期各天的表皮、头部和马氏管组织中的 PLK 进行 Western blot 检测。如图 4 所示，PLK 在家蚕 5 龄期表皮组织中的表达水平是先降后升，以第 8 天最高；而在头部和马氏管组织中，PLK 的表达差异不是很明显，总体上 5 龄前期比后期表达量稍高。

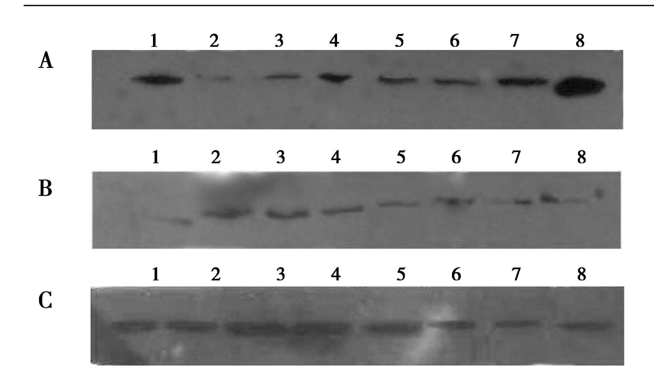


图4 Western blot 分析家蚕 5 龄不同日龄幼虫表皮(A)、头部(B)和马氏管(C)中 PLK 的表达

Fig. 4 Western blot analysis of pyridoxal kinase expression in cuticle (A), head (B) and Malpighian tubules (C) on different days of the 5th instar of *Bombyx mori*

1: 第 1 天 Day-1; 2: 第 2 天 Day-2; 3: 第 3 天 Day-3; 4: 第 4 天 Day-4; 5: 第 5 天 Day 5; 6: 第 6 天 Day-6; 7: 第 7 天 Day-7; 8: 第 8 天 Day-8.

2.3 家蚕发育过程中 PLK 基因的转录水平变化

用荧光定量 PCR 方法，并以 18S rRNA 为内参，对 PLK 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织中的转录水平进行分析(表 1，图 5)。从表 1 和图 5 的数据处理结果中可以看出，PLK 基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织中的转录情况存在较大差异，由高到低依次为：精巢、马氏管、头部、中肠、卵巢、脂肪体、表皮、丝腺。

3 讨论

本研究结合荧光定量 PCR 技术和 Western blot 方法对家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织中 PLK 基因的转录与表达情况进行分析，同时也对家蚕 4 个发育时期以及 5 龄期不同日龄的表皮、头部和马氏管中PLK的表达进行了检测。Western blot检测结果表明，PLK 在家蚕卵、蛹、蛾中均有少量表达且表达量差异不明显，而在 5 龄幼虫中表达量较高；PLK 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织中的表达由高到低依次为精巢、马氏管、表皮、中肠、头部、卵巢、脂肪体、丝腺。而荧光定量 PCR 检测表明，PLK 基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织中的转录由高到低为精巢、马氏管、头部、中肠、卵巢、脂肪体、表皮、丝腺。综合分析发现，头部组织中 PLK 基因在转录水平上表达量较高，而在翻译水平上表达量较低；中肠组织中 PLK 基因在转录水平上相对较低，而在翻译水平上相对较高。两种方法的分析结果存在个别组织差异性，推测可能有两种原因，其一是由于基因的表达包含转录和翻译两个层面，

表 1 家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织器官中 PLK mRNA 的转录水平

Table 1 Transcription levels of PLK gene in different tissues of day-3 5th instar larva of *Bombyx mori*

组织 Tissues	18S rRNA 平均 Ct 值 Average Ct value of 18S rRNA	PLK 平均 Ct 值 Average Ct value of PLK	ΔCt	ΔΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$PLK (相对于丝腺 Relative to silk glands)
头部 Head	12.86 ± 0.545	23.75 ± 0.085	10.88 ± 0.487	−4.16 ± 0.557	17.69 ± 0.557
表皮 Cuticle	9.83 ± 0.030	23.09 ± 0.020	13.27 ± 0.241	−1.76 ± 0.195	3.39 ± 0.195
丝腺 Silk glands	9.12 ± 0.072	24.14 ± 0.120	15.03 ± 0.027	0.00 ± 0.103	1.00 ± 0.103
脂肪体 Fat body	10.11 ± 0.132	23.19 ± 0.075	13.07 ± 0.198	−1.96 ± 0.242	3.88 ± 0.202
马氏管 Malpighian tubules	9.65 ± 0.885	19.96 ± 0.465	10.30 ± 0.642	−4.72 ± 1.230	26.44 ± 1.020
中肠 Midgut	13.78 ± 0.380	25.53 ± 0.230	11.75 ± 0.127	−3.28 ± 0.365	9.69 ± 0.365
精巢 Spermary	15.70 ± 0.980	25.78 ± 0.125	10.08 ± 1.052	−4.94 ± 1.028	30.79 ± 1.028
卵巢 Ovary	12.66 ± 0.240	25.09 ± 0.085	12.42 ± 0.186	−2.61 ± 0.253	6.09 ± 0.253

表中数据为平均值 ± 标准误。Data in the table are mean ± *SE*. ΔCt = Ct(PLK) − Ct(18S rRNA); ΔΔCt = ΔCt(各个组织 Each tissue) − ΔCt(丝腺 Silk glands). 图 5 同 The same for Fig. 5.

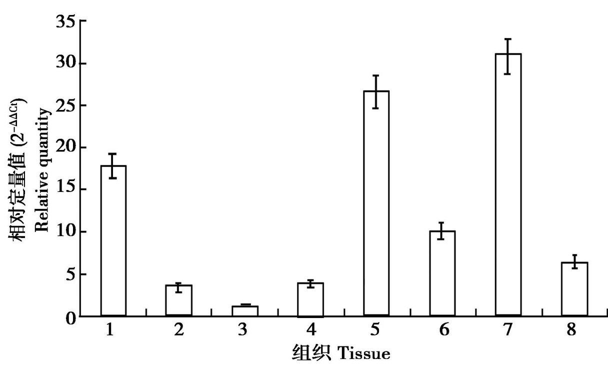


图 5 家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织中 PLK 基因的转录水平

Fig. 5 The transcrition level of pyridoxal kinase gene in different tissues of day-3 5th instar larva of *Bombyx mori*

1: 头部 Head; 2: 表皮 Cuticle; 3: 丝腺 Silk glands; 4: 脂肪体 Fat body; 5: 马氏管 Malpighian tubules; 6: 中肠 Midgut; 7: 精巢 Spermary; 8: 卵巢 Ovary.

而真核基因的转录和翻译发生的时间、位点存在着时空间隔，而转录后又有转录产物的降解、翻译以及翻译后加工、修饰等好几个层面，所以转录水平与翻译水平在个别组织中并不完全一致；其二也可能是在翻译水平上进行 Western blot 时没有增设内参，从而造成个别组织出现些许差异。

研究还发现，家蚕表皮组织中的 PLK 在整个 5 龄期不同天的表达差异是很明显的，第 1 天和第 8 天的表达量很高，可能是因为家蚕表皮组织在龄期交替时发生着新旧组织替换的剧烈变化，表皮组织随着新旧细胞替换性发育的进程，蕴育着丰富的相关蛋白质的合成与代谢。

马氏管是家蚕的排泄器官，氨基酸等物质代谢比较活跃，而 PLP 是 140 多种细胞酶的辅酶，涉及氨基酸代谢的各种反应和其他多种代谢过程，故 PLK 在马氏管中高度表达。沈飞英等(2005)对家蚕不同时期的中部丝腺细胞蛋白质变化的研究表明 5 龄后期丝腺中基因转录及蛋白翻译处于活跃状态。家蚕丝腺在快速合成丝蛋白时，需要大量氨基酸及时供给，PLP 是氨基酸代谢中多种酶的关键辅酶，而 PLK 又是家蚕细胞内决定 PLP 浓度的 3 种酶之一，因此猜测 PLK 在家蚕生长发育过程中与丝腺合成丝蛋白有关。但本研究中 PLK 在家蚕丝腺组织中未明显检测到，可能是因为丝腺组织中总蛋白含量远高于其他组织，而 Western blot 方法检测的标准是各组织总蛋白量相同，在各组织总蛋白量相同的情况下，丝腺中因杂蛋白含量很高相对的 PLK 含量就非常低，故而未被明显检测到。

致谢 实验得到本研究室已毕业硕士研究生石瑞君、王振、张平平的帮助，特此致谢！

参 考 文 献 (References)

Cao P, Gong Y, Tang L, Leung YC, Jiang T, 2006. Crystal structure of human pyridoxal kinase. *J. Struct. Biol.*, 154(3): 327 – 332.

Hurwitz BJ, 1953. The enzymatic phosphorylation of pyridoxal. *Journal of Biological Chemistry*, 205: 935 – 947.

Kerry JA, Rohde M, Kwok F, 1986. Brain pyridoxal kinase: purification and characterization. *Eur. J. Biochem.*, 158(3): 581 – 585.

Kwok F, Churchich JE, 1979. Brain pyridoxal kinase: purification, substrate specificities, and sensitized photodestruction of an essential histidine. *Journal of Biological Chemistry*, 254(14): 6489 – 6495.

Lum HK, Kwok F, Samuel CL, 2002. Cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* pyridoxal kinase. *Planta*, 215(5): 870 – 879.

Maras B, Valiante S, Orru S, Simmaco M, Barra D, Churchich JE, 1999. Structure of pyridoxal kinase from sheep brain and role of the tryptophanyl residues. *Journal of Protein Chemistry*, 18(3): 259 – 268.

McCormick DB, Gregory ME, Snell EE, 1961. Pyridoxal phosphokinases Ⅰ. Assay, distribution, purification, and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 236(7): 2076 – 2084.

Neary JT, Diven WF, 1970. Purification, properties, and a possible mechanism for pyridoxalkinase from bovine brain. *Journal of Biological Chemistry*, 245: 5585 – 5593.

Safo MK, Musayev FN, Hunt S, Salvo ML, Scarsdale N, Schirch V, 2004. Crystal structure of the PdxY protein from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(23): 8074 – 8082.

Salvo ML, Hunt S, Schirch V, 2004. Expression, purification, and kinetic constants for human and *Escherichia coli* pyridoxal kinase. *Protein Expression and Purification*, 36: 300 – 306.

Shen FY, Zhong BX, Lou CF, Su SK, Xu HS, Yan XP, Yao GH, Lu YC, 2005. A comparison of the protein composition of the middle silk gland cells of the fifth instar larvae of silkworm. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(5): 1052 – 1058. [沈飞英，钟伯雄，楼程富，苏松坤，徐海圣，颜新培，姚国华，陆云翀，2005. 家蚕五龄幼虫中部丝腺细胞的蛋白质组成比较. 中国农业科学，38(5): 1052 – 1058]

Shi RJ, Zhang JY, Jiang CJ, Huang LQ, 2007. *Bombyx mori* pyridoxal kinase cDNA cloning and enzymatic characterization. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(8): 683 – 690.

Wrenger C, Eschbach ML, Müller IB, Warnecke D, Walter RD, 2006. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7): 5242 – 5248.

Zhang JY, Huang LQ, 2003a. Distribution, movement and metabolism of vitamin B_6 compounds in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(3): 277 – 281. [张剑韵，黄龙全，2003a. 家蚕体内维生素 B_6 的存在形态和转换代谢. 昆虫学报，46(3): 277 – 281]

Zhang JY, Huang LQ, 2003b. Effects of vitamin B_6 deficiency on the amino acid metabolism, fatty acid metabolism and aminotransferase activity of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 46(4): 436 – 440. [张剑韵，黄龙全，2010, 2003b. 家蚕体内因缺乏维生素 B_6 而引起的若干代谢变动. 昆虫学报，46(4): 436 – 440]

Zhang PP, Zhang JY, Huang LQ, 2010. Fusion expression and purification of pyridoxal kinase of *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 53(9): 957 – 961. [张平平，张剑韵，黄龙全，2010. 家蚕吡哆醛激酶的融合表达与纯化. 昆虫学报，53(9): 957 – 961]

(责任编辑：赵利辉)